

Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Licenciatura em Bioquímica

Departamento de Ciências Biológicas e Bioengenharia

Ano Letivo de 20011/2012

Mobilização da calmodulina e da neurogranina depende da variação da concentração de cálcio

Projeto final da Licenciatura em Bioquímica realizado por:

Matias Cardoso, N.º 23074

Orientador: Prof. Manuel Aureliano Alves (UALG)

Faro, 10 de Setembro de 2012

Índice

Resumo.....	II
Abstract	III
1. Introdução.....	1
2. Métodos de estudo da mobilização da calmodulina e neurogranina em neurónios	3
2.1 Quantificação dos níveis de Ca^{2+} através de várias sondas de fluorescência.....	4
2.2 Quantificação da transmissão sináptica.....	5
2.3 Estudo de mecanismos de plasticidade sináptica	6
2.4 Utilização de sondas para análise sináptica.....	6
3. Mobilização da calmodulina e neurogranina em neurónios	8
3.1 Localização da Calmodulina e da Neurogranina em células CA1 do hipocampo do rato ...	8
3.2 Diferenças entre a quantidade de CaM e Ng nas regiões CA1, CA2 e CA3 no hipocampo do rato.....	9
3.3 Quantificação da CaM e Ng deslocadas na região CA1	11
3.4 A adição de EGTA causa alterações no cálcio intracelular	13
3.5 Localização do complexo CaM/Ng.....	15
3.6 Translocação da calmodulina e da neurogranina da soma para as dendrites durante a sinapse mediante estimulação de alta frequência.	17
3.7 Estudo da CaM e Ng deslocalizadas da soma para as dendrites	18
4. Conclusão	21
Referências	IV

Resumo

A calmodulina (CaM) e neurogranina (Ng) são duas proteínas expressas em células nervosas, localizadas maioritariamente no soma e no núcleo em células do hipocampo. Foi detetado que existia uma mobilização da calmodulina e da neurogranina do soma para as dendrites quando era induzido uma variação da concentração de cálcio, pela adição de um agente quelante (EGTA). Sabendo que a concentração intracelular de cálcio é de 100 nM, pela relação da intensidade de fluorescência com a concentração de cálcio, verificou-se que houve uma redução de 40 nM da concentração intracelular de cálcio em cortes tratados com EGTA durante 15 minutos. Estas proteínas são necessárias em grandes quantidades durante a atividade neuronal na zona das dendrites para ativar os enzimas dependentes de cálcio\calmodulina. A CaM regula uma serie de processos biológicos como por exemplo na regulação da ativação das cinases Ca^{2+} /CaM-dependentes e pela sua grande afinidade com o cálcio. Para obter um conhecimento mais avançado sobre a interação destas duas proteínas analisou-se se estas respondem a estímulos de alta frequência de uma forma coordenada. Verificou-se que apos estímulo existia uma mobilização da CaM e da Ng para os dendrites indicando que a CaM e Ng são necessárias na zona dos dendrites durante atividade neuronal. Em estudos em células sem a capacidade de expressar a Ng a CaM não era mobilizada com a mesma eficácia registada em células normais que expressam a Ng. Verificou-se também que a mobilização da CaM também depende da ativação de recetores NMDA já que na presença do inibidor AP5 a mobilização não foi tão eficaz como em condições normais. Concluiu-se que a mobilidade da CaM e da Ng da soma para as dendrites depende da variação da concentração de cálcio e que esta mesma mobilização dá-se também numa situação de estímulo eletrofisiológico.

Abstract

Calmodulin (CaM) and neurogranina (Ng) are two proteins expressed in nerve cells, primarily localized in the soma and nucleus in cells in the hippocampus. It was detected that there was a mobilization of calmodulin and neurogranina from the soma to the dendrites when was induced a variation of calcium concentration by the addition of a chelating agent (EGTA). Knowing the intracellular calcium concentration is 100 nM, by the ratio of fluorescence intensity is possible to estimate the concentration of calcium, It was found that the concentration intracellular of calcium decreases 40 nM in slices treated with EGTA for 15 min. These proteins are required in large quantities during neuronal activity in the area of dendrites to activate the enzymes calcium-calmodulin dependents. The CaM regulates a number of biological processes such as the regulation of activation of kinases Ca^{2+} / CaM-dependents and its high affinity for calcium. For a more advanced knowledge about the interaction of these two proteins examined whether these stimuli respond to high frequency in a coordinated way. It was found that after stimulation there was a mobilization of CaM and Ng for the dendrites indicating that CaM and Ng are needed in the area of dendrites during neuronal activity. In studies on cells lacking the ability to express Ng, the CaM was not mobilized as effectively recorded in normal cells with expression of Ng. It was also found that mobilization of CaM also depends on activation of NMDA receivers since the presence of the inhibitor AP5, the mobilization of CaM was not as effective as under normal conditions. It was concluded that the mobility of CaM and Ng sum for the dendrites depends on the variation of the concentration of calcium mobilization and that the same occurs also in a situation electrophysiological stimulus.

Abreviaturas: CaM-Calmodulina; Ng-Neurogranina; EGTA- Ethylene Glycol Tetraacetic Acid; AP5- Amino-5-Fosfonovalerico; ACSF- Fluido cérebroespinal artificial (Artificial cerebral spinal fluid); $[Ca^{2+}]_i$, - Concentração intracelular de cálcio.

1. Introdução

O cálcio intracelular na sua forma iónica é responsável pela regulação\ativação de proteínas e de diversas funções celulares¹, em termos gerais a sinalização do cálcio é responsável pelo crescimento celular, desenvolvimento e pelo processo de apoptose celular, em neurónios está associado à sustentabilidade do neurónio, desenvolvimento do axónio e a força sináptica^{2,3}.

A desregulação da concentração intracelular do cálcio está associada com o aparecimento de doenças neurodegenerativas³. O estudo das vias de sinalização do cálcio através de técnicas de microscopia de fluorescência pode ser uma ferramenta fundamental para a compreensão do papel da homeostasia do cálcio nos processos biológicos. Utilizando técnicas como a microscopia confocal ou coloração imunoquímica podem-se obter vários modelos de neurónios diferenciados, também é possível visualizar vários eventos ao mesmo tempo, estas técnicas são muito eficazes já que não existe danificação do tecido porque não há contacto entre o neurónio e um eletródo como acontece nas técnicas eletrofisiológicas.

Neste trabalho pretende-se mostrar que a partir de técnicas de microscopia de fluorescência e por estimulação de alta frequência é possível estudar “in vivo” as vias de sinalização do cálcio em neurónios da região CA1 do hipocampo pela análise do deslocamento da calmodulina e da neurogranina da soma para as dendrites quando há uma desregulação da concentração intracelular de cálcio, devido à afinidade destas proteínas com o metal. A calmodulina (CaM) e a neurogranina (Ng) são duas neuroproteínas que estão ligadas à regulação das sinapses. A calmodulina (Fig.1) é uma proteína expressa em todas as células eucarióticas, está presente no encéfalo e no tecido cardíaco, enquanto a neurogranina é expressa maioritariamente no encéfalo dos mamíferos. A calmodulina pertence à superfamília das EF-hand, com quatro locais de ligação ao cálcio, devido a sua afinidade com o cálcio é responsável pela regulação da transdução do sinal do cálcio, como por exemplo a ativação de

enzimas. Calmodulina está presente em elevadas concentrações no cérebro (100 mM)⁴. Além das suas funções mais gerais, a CaM tem também uma série de funções específicas de transdução de sinais de Ca^{2+} em neurónios, por exemplo, a regulação dos recetores de glutamato, canais iônicos, síntese do óxido nítrico⁵ e pode ainda afetar a plasticidade sináptica³. Existem ainda outros dois principais modos de ação indireta da calmodulina que e através da ativação de proteínas-alvo como as cinases Ca^{2+} /CaM-dependentes (CaMKs)⁶ e a calcineurina².

Nos neurónios, pensa-se que a neurogranina tem um papel importante na regulação da interação direta da calmodulina com o cálcio^{4,7}. Durante e após atividade neuronal a concentração extracelular de cálcio diminui, utilizando o modelo de “low calcium” pela adição de um agente quelante foi possível analisar a localização da CaM e Ng e as consequências da diminuição da concentração extracelular de cálcio no comportamento destas duas proteínas em células nervosas do hipocampo, que neste caso verificou-se uma mobilização da CaM e da Ng do soma para as dendrites. Foi também estudado o efeito da estimulação de alta frequência e também se verificou essa mesma mobilização para as dendrites, mas esta só se deu nas zonas cercanas ao eletródo, indicando que a CaM e Ng são necessárias nas dendrites durante atividade neuronal, já que em estudos em células sem a capacidade de expressar a Ng a CaM não era mobilizada com a mesma eficácia do que nas células que expressam a Ng⁶.

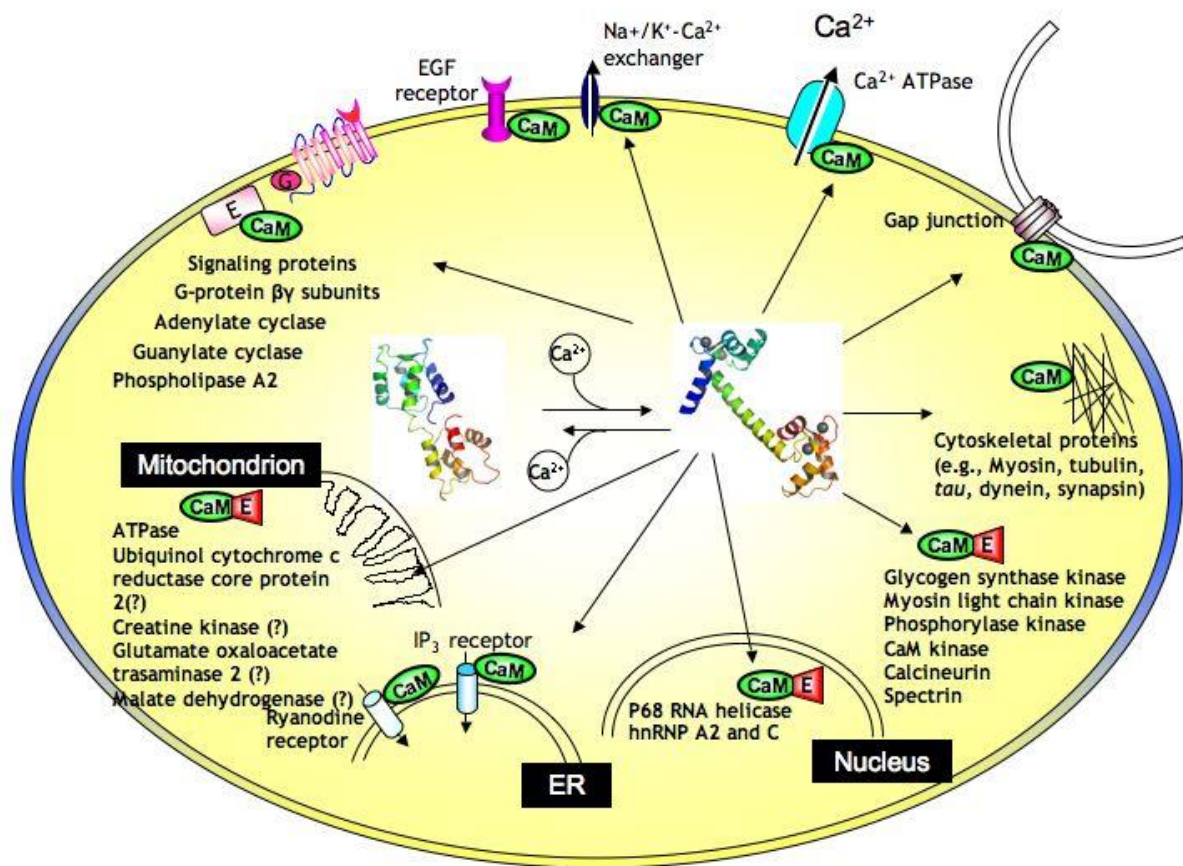


Figura 1- Representação da estrutura da calmodulina antes e depois de se ligar ao cálcio e a distribuição celular das proteínas que se ligam à calmodulina em diferentes compartimentos celulares, incluindo o núcleo (Nucleus), retículo endoplasmático (ER) e mitocôndrias (Mitochondrion). Calmodulina tem um papel importante na interação com proteínas de membrana (por exemplo, canais de iões, bombas, e junções de hiato), proteínas do citoesqueleto, e uma variedade de enzimas no citoplasma⁹.

2. Métodos de estudo da mobilização da calmodulina e neurogranina em neurónios

Os cortes de hipocampo foram obtidos a partir de ratos criados segundo as normas da associação protetora de animais americana, os cortes foram mantidos numa solução de ACSF (artificial cerebrospinal fluid) a pH 7.4, contendo outros sais e glucose. Para a estimulação de alta frequência foram utilizados eletródos de vidro (1-4 MΩ). Os anticorpos de Ng foram obtidos a partir de coelhos e para a CaM a partir de ratos. Para a coloração imunoquímica as amostras de tecido foram postas em soro e incubadas juntamente com os anticorpos das duas

proteínas em estudo e reveladas com o enzima repórter ImmPRESS. As imagens das amostras foram reveladas por microscopia confocal e a quantificação de fluorescência foram obtidas por comparação entre a soma e as dendrites. Para a revelação do cálcio por fluorescência foi utilizado a sonada Fluo-4AM e as imagens foram obtidas por microscopia eletrônica (two-photon) e a intensidade de fluorescência foi medida através do mesmo programa utilizado anteriormente^{4,6}.

O estudo da variação da homeostasia do cálcio assim como as suas consequências pode ser realizado a partir de diferentes metodologias, como é descrito seguidamente:

2.1 Quantificação dos níveis de Ca^{2+} através de várias sondas de fluorescência.

As variações da concentração intracelular de cálcio estão relacionadas com várias interações moleculares que por sua vez intervêm em diversos processos biológicos, por isso é essencial associar técnicas de quantificação da concentração de cálcio de modo a perceber melhor as causas e consequências desse influxo de cálcio nas células. Por exemplo a CaM é uma proteína que controla as alterações dos níveis intracelular de cálcio e a sua interação com o metal permite-lhe controlar uma serie de interações, sejam elas com enzimas, outras proteína e canais de iões, por isso um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, pode causar inúmeras respostas anormais por parte da CaM, daí ser necessário obter um método para quantificar e visualizar as alterações dinâmicas dos níveis de cálcio e a sua interação com a CaM em células vivas.

O estudo da variação da concentração de cálcio na célula tem vindo a ser determinante para entender as vias de sinalização do mesmo, um dos métodos é a utilização de uma sonda com propriedades quelantes que sequestram o cálcio originando uma excitação que emite fluorescência, ao microscópio de fluorescência e é possível associar a intensidade de fluorescência emitida com a concentração intracelular de cálcio. Hoje em dia com os avanços tecnológicos e com a descoberta da GFP, é possível destetar e quantificar os níveis de cálcio

em sistemas biológicos *in vivo*⁸. Esta proteína de pequenas dimensões quando interage com o cálcio emite uma luz azul que quando vista ao microscópio apresenta uma luz verde fluorescente, esta proteína devido à sua pequena dimensão e fácil manipulação genética deu a origem a outros marcadores com outras cores, permitindo por exemplo colorir diferentes organelos numa célula, seguindo a mesma linha podem-se construir diferentes sondas através da manipulação genética e síntese química de novos fluoróforos como por exemplo, a Calcium Green FIAsh¹ (CaGF) ou como o sensor para altas concentrações de cálcio no retículo endoplasmático¹⁰ (CatchER). Uma das sondas mais conhecidas é o fura-2¹¹, excita-se a níveis de absorvância de 340 nm e emite fluorescência a 510 nm apresentando uma cor verde (Fig.2). Por outro lado a sonda CaGF é um triplo híbrido que combina a fluoresceína com dois substituintes de arsénio e o BAPTA que é um agente quelante com uma estrutura semelhante ao fura-2, o BAPTA serve para ligar-se ao cálcio, a fluoresceína é o fluoróforo e o arsénio serve para formar quatro ligações com o enxofre de dois pares de cisteínas, podendo assim ligar-se a várias proteínas, esta sonda emite fluorescência a 530 nm (Fig.3). Por último a sonda de cálcio utilizada para medir os níveis de cálcio no retículo endoplasmático, CatchER com uma estrutura baseada no fluoróforo da proteína EGFP, emite fluorescência a 510 nm (Fig4).

2.2 Quantificação da transmissão sináptica

A revelação do cálcio por fluorescência permite o estudo da dinâmica do cálcio nas sinapses, assim como a concentração de cálcio intracelular durante os vários estados: repouso, estimulação sináptica e atividade espontânea. Através da comparação da intensidade de fluorescência no repouso e estimulação sináptica com a intensidade de saturação do indicador de cálcio pode-se determinar a concentração de cálcio não só em condições padrão como durante a ativação e durante a plasticidade sináptica¹².

2.3 Estudo de mecanismos de plasticidade sináptica

Utilizando as técnicas de microscopia de fluorescência e a estimulação elétrica em simultâneo mostrou que há uma libertação de glutamato que está relacionado com o estímulo elétrico, que contribui muito para ativação sináptica. Técnicas de microscopia de fluorescência utilizadas para neurotransmissores específicos também são ferramentas para induzir atividade sináptica em determinados sítios específicos.

Para induzir atividade sináptica é preciso recorrer a modelos de alteração da concentração intracelular de cálcio, estudos já realizados mostram que a indução de uma potenciação de longa duração por estímulo elétrico causa um aumento rápido e considerável da concentração de cálcio nas dendrites, por outro lado a despotencialização causa um aumento mínimo da concentração de cálcio^{12,13}.

2.4 Utilização de sondas para análise sináptica

Uma das vantagens destas técnicas, como já foi referido anteriormente é a capacidade de captar imagens ao mesmo tempo de uma população de sinapses e assim, permite o estudo de um maior número de sinapses. Esta técnica também permite o estudo das dendrites durante a transmissão sináptica assim como permite o estudo da plasticidade do neurónio.

As alterações à plasticidade sináptica são sempre iniciadas por variações da concentração intracelular de cálcio e transmitidas através da presença de proteínas dependentes de cálcio como a calmodulina. Existem vários fatores a natureza e a complexidade das vias de sinalização das proteínas Ca^{2+} /CaM dependentes, como por exemplo a quantidade de cálcio e a sua proveniência^{12,13}.

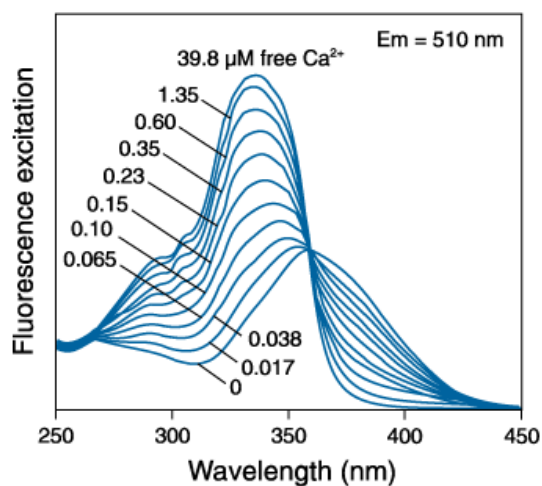


Figura 2- Gráfico da excitação de fluorescência (fluorescence excitation) do Fura-2 versus comprimento de onda¹⁴ (Wavelength (nm)) para diferentes concentrações de cálcio (0-39.8 μM), o Fura-2 emite fluorescência nos 510 nm (Em=510nm).

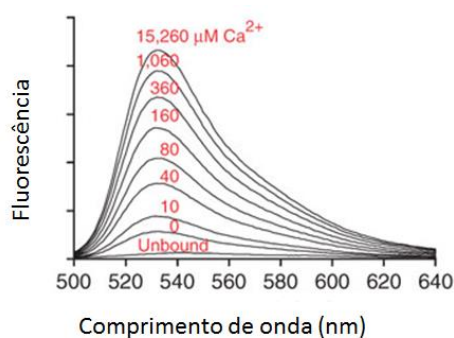


Figura 3- Gráfico da intensidade de fluorescência versus comprimento de onda de emissão do CaGF para diferentes concentrações de cálcio¹ (0- 15,260 μM).

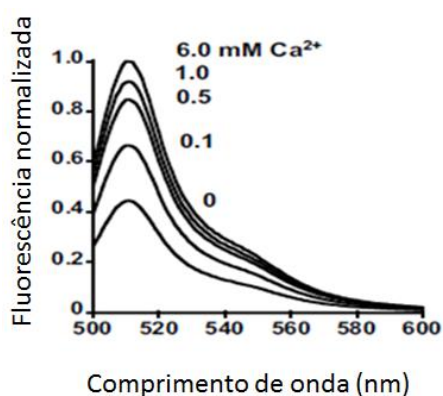


Figura 4- Gráfico da intensidade de fluorescência normalizada versus comprimento de onda (nm) de emissão do CatchER para diferentes concentrações de cálcio¹⁰ (0- 6.0 mM).

3. Mobilização da calmodulina e neurogranina em neurónios

A calmodulina e a neurogranina são duas neuroproteínas que intervêm nas vias de sinalização em neurónios. Através de técnicas de microscopia e estimulação de alta frequência pretende-se estabelecer qual é a principal função e se há algum tipo de relação entre elas.

3.1 Localização da Calmodulina e da Neurogranina em células CA1 do hipocampo do rato

No estudo da localização da calmodulina e neurogranina analisaram-se células provenientes de cortes de tecido do hipocampo na região CA1 que posteriormente foram analisados ao microscópio (Fig.5). Verificou-se que a CaM localiza-se em maior quantidade no núcleo, enquanto a Ng encontra-se distribuída nas dendrites e soma dos neurónios, verificou-se ainda a colocalização da CaM e Ng no citoplasma, onde se pode ver a CaM (vermelho) e a Ng (verde) (A-C). Pode-se observar que a CaM está localizada maioritariamente no núcleo das células piramidais (py) (A), também é possível observar que a Ng está distribuída pelo núcleo, citoplasma e dendrites (B) dentro do stratum radiatum (Sr). Na imagem conjunta (C) é possível confirmar a colocalização da CaM e Ng no núcleo rodeado por um anel de Ng citoplasmática. Por outro lado no subículo é possível observar uma colocalização uniforme da CaM e da Ng no núcleo, citoplasma e dendrites. Numa análise conjunta comprovou-se que existe uma colocalização na soma maior do que nas dendrites. A baixa quantidade de CaM nas dendrites em relação à soma leva a pensar que deve existir uma mobilização da calmodulina da soma para as dendrites e que a Ng tem um papel muito importante nesse aspeto. A Ng interage com a CaM/Ca²⁺, acelerando a dissociação do cálcio, isto faz com que haja uma mobilização do complexo Ng/CaM do soma para os dendrites onde se vai ligar ao cálcio que depois é direcionado para a ativação das cinases Ca²⁺/CaM-dependentes⁴.

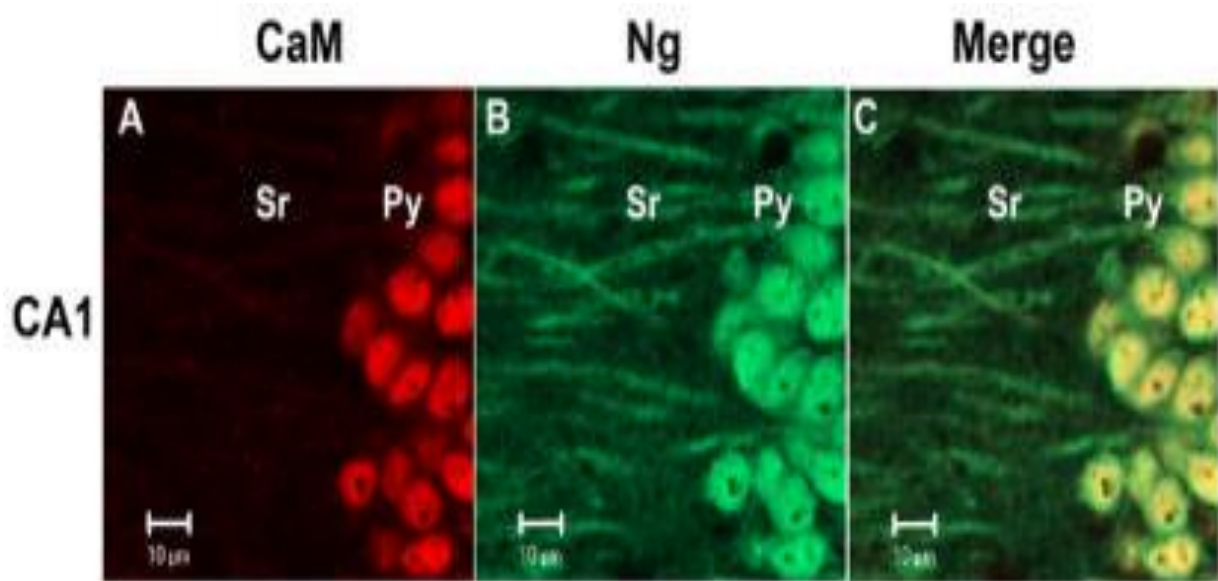


Figura 5- Localização da calmodulina (vermelho) e neurogranina (Verde) nos neurónios piramidais (py) da região CA1 e subículo do hipocampo⁴. Através de coloração imunquímica e revelação de imagens por microscopia de células da região CA1 do hipocampo do rato (A-D) e no subículo (E-F). Na região CA1 do hipocampo a CaM está mais concentrada no núcleo (A) assim como a Ng onde também era visível no citoplasma (B).

3.2 Diferenças entre a quantidade de CaM e Ng nas regiões CA1, CA2 e CA3 no hipocampo do rato

Como foi referido anterior mente a CaM e a Ng estão localizadas nas várias camadas do hipocampo. Após tratamento dos cortes com EGTA/ACSF, que promovem a mobilização da CaM e da Ng da soma para as dendrites dos neurónios da região CA1. Esse tráfico é menor quando comparadas com outros neurónios de outras regiões vizinhas (Fig.6), nas regiões CA2 e CA3 (Fig.6E e F) verifica-se que a redução da concentração extracelular de cálcio por ação do EGTA, causa a saída da CaM do núcleo para o citoplasma e para as dendrites próximas mas não se verificou grandes diferenças nas dendrites distantes, na imagem onde estão representas a CaM e Ng em simultâneo é possível observá-las em grandes quantidades no citoplasma e nas dendrites mais próximas nas regiões CA2 e CA3 enquanto na região CA1 verifica-se uma maior quantidade de CaM e Ng nas dendrites mais distantes (Fig.6F). verificou-se ainda que as células nas regiões CA2 e CA3 parecem ser maiores do que na região CA1

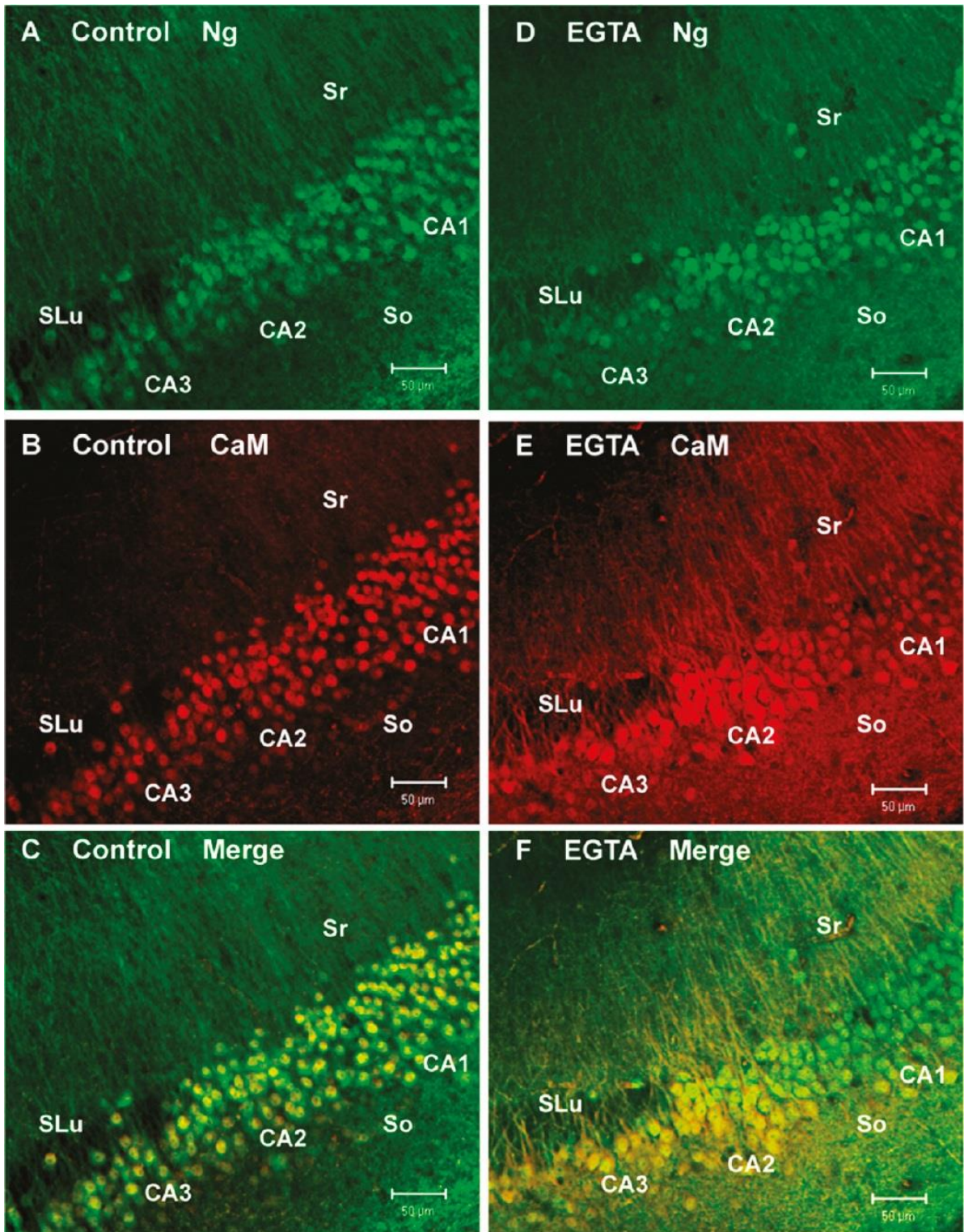


Figura 6- Diferentes respostas ao EGTA por partes das células das regiões CA1, CA2 e CA3 no hipocampo do rato⁴. As células foram tratadas com o EGTA durante 15 minutos (D-F). na imagem do controlo (C) a CaM e Ng aparecem colocalizadas no núcleo com uma pequena aparição no citoplasma e dendrites no stratum radiatum (Sr) e stratum oriens (So). Apos tratamento com EGTA (F) a CaM presente no soma na região CA1 diminuiu por outro lado nas regiões CA2 e CA3 a CaM ficou retida no soma.

3.3 Quantificação da CaM e Ng deslocadas na região CA1

Através da intensidade de fluorescência é possível determinar a posição da CaM e da Ng (Fig.8). No controlo (Fig. 8A) o pico mais alto de intensidade de fluorescência da CaM (vermelho) e Ng (verde) corresponde à camada celular em células piramidais e nas dendrites foi estimado que a intensidade é de 10 a 30% menor do que foi quantificado no soma. Após tratamento com uma solução de EGTA/ACSF durante 20 min a intensidade de CaM e de Ng no soma é reduzida quando comparada ao controlo (Fig. 8B). A translocação da Ng do soma para os dendrites ainda é detetada 5min após adição de EGTA/ACSF, enquanto a CaM sofre uma diminuição logo nos primeiros 5 minutos mas há um pequeno aumento a partir dos 10 min. Passados 15min há um aumento da CaM na zona das dendrites, a adição de ACSF sem o agente quelante repõe a distribuição padrão na célula destas duas proteínas (Fig. 7).

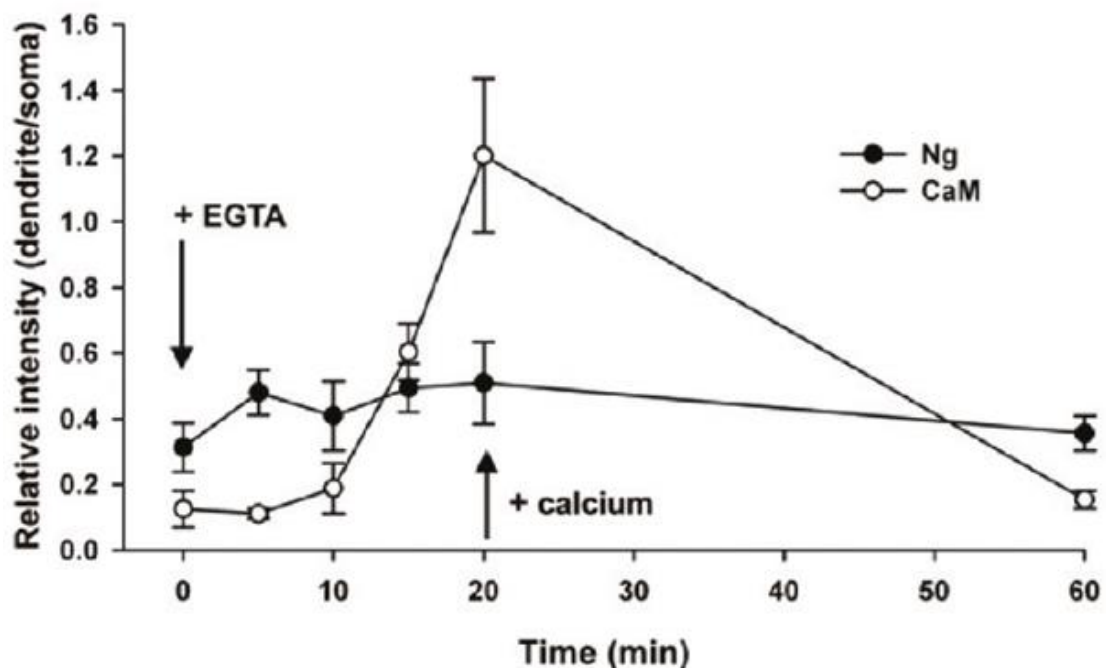


Figura 7- Gráfico da intensidade de fluorescência relativa entre dendrites e soma versus o tempo em minutos⁴.

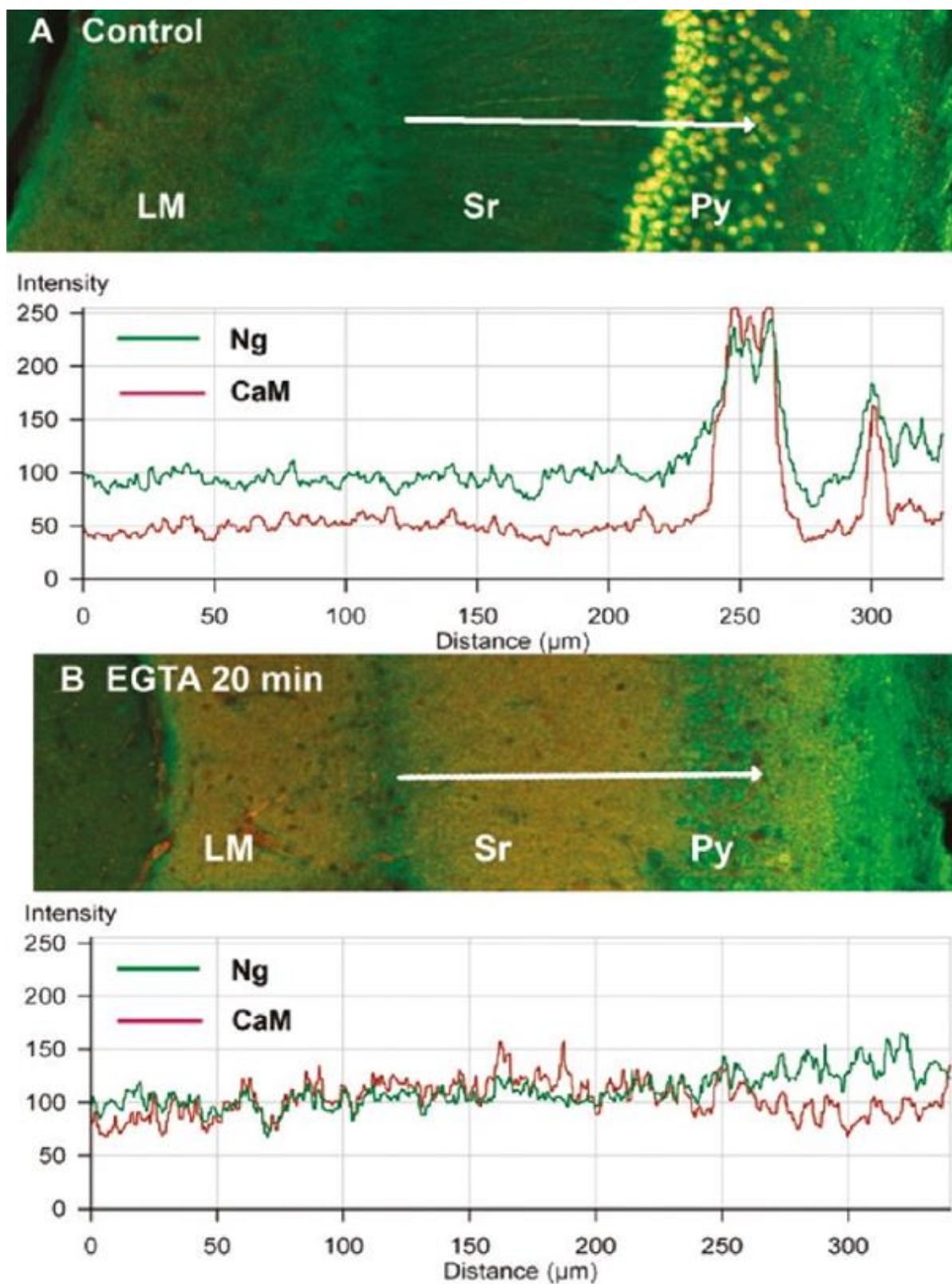


Figura 8- Quantificação da intensidade de fluorescência revelada pela Ng e CaM⁴. Em células de controle (A) e células tratadas com EGTA/ACSF durante 20 minutos (B). foram analisadas a intensidade de fluorescência das dendrites na área Sr para a zona das células piramidais Py na região CA1 do hipocampo.

3.4 A adição de EGTA causa alterações no cálcio intracelular

Para estudar o efeito de um agente quelante como o EGTA em células do hipocampo, mais precisamente ao nível da concentração intracelular de cálcio. Adicionou-se às células dos cortes do hipocampo um indicador de cálcio que pode ser revelado ao microscópio eletrónico, o Fluo-4AM. A seguir adicionou-se uma solução de ACSF que originou uma diminuição da intensidade da fluorescência do fluo-4, que podia interferir com os resultados, visto isso, traçou-se uma curva padrão correspondente ao controlo antes de adicionar a solução de EGTA/ACSF (Fig.9). Seguidamente foram reveladas imagens de células em contacto com o soro ACSF durante 5 minutos, depois foi adicionada uma solução de EGTA/ACSF durante 15 minutos, aos 20 minutos do ensaio adicionaram-se 10 μ M de 4-Br-A23187, um ionóforo de cálcio, a adição do ionóforo de cálcio na presença de EGTA/ACSF foi utilizada para estimar aproximadamente a redução máxima de a $[Ca^{2+}]_i$ em neurónios da região CA1, 5 minutos após adição do EGTA (10 min do ensaio) a $[Ca^{2+}]_i$ diminuiu cerca de 30% em relação ao controlo, e passados 10 e 15 minutos a concentração diminuiu aproximadamente 35 e 40% respetivamente. Passados 30 minutos do ensaio e 10 minutos da adição do ionóforo, verificou-se que houve uma diminuição da concentração intracelular de cálcio, uma vez que a $[Ca^{2+}]_i$ dos neurónios é de 100 nM⁴ e o Kd (constante de dissociação) do fluo-4/Ca²⁺ é 1 μ M⁴ in situ, a redução da fluorescência pode ser utilizada como um parâmetro para medir a redução da $[Ca^{2+}]_i$. Pela intensidade de fluorescência pode-se estimar que 15 minutos após adição da EGTA/ACSF a $[Ca^{2+}]_i$ diminuiu cerca de 40nM porque houve uma diminuição de 40% de intensidade de fluorescência, pela mesma estimativa pode-se dizer que a redução de 15% da intensidade de fluorescência e que indicam cerca 15 nM $[Ca^{2+}]_i$ deve-se à sonda utilizada. No mesmo ensaio passados 32 minutos adicionou-se uma solução tampão com cálcio e se verificou que as células acabaram por voltar ao normal no que diz à intensidade de fluorescência, demonstrando que o EGTA não causa danos irreversíveis nas

células. A mobilização da Ng atingiu o máximo após exposição com EGTA/ACSF durante 5 minutos (Fig.7).

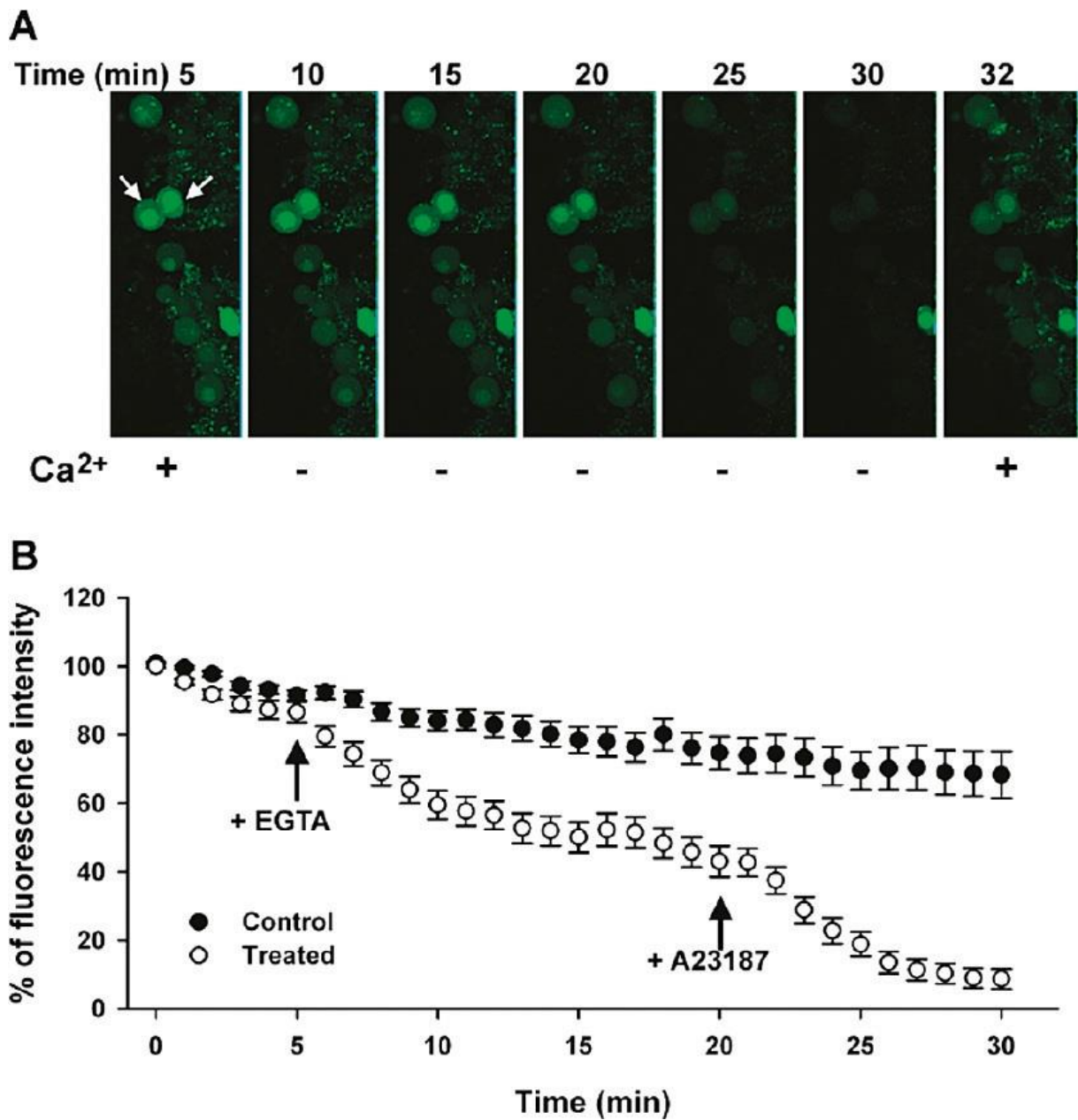


Figura 9- Alterações na intensidade de fluorescência devido à variações da concentração intracelular do cálcio por ação do EGTA⁴. O EGTA foi adicionado passados 5 minutos e aos 20 minutos de ensaio foi adicionado um ionóforo cálcio durante 10 minutos onde é visível uma redução da intensidade de fluorescência. Aos 32 minutos foi adicionado uma solução tampão contendo cálcio.

3.5 Localização do complexo CaM/Ng

O estudo da colocalização da CaM e da Ng na zona dos dendrites em células CA1 estimuladas através de coloração imunoquímica e microscopia confocal, demonstra que há um aparecimento da CaM e Ng em conjunto na zona superficial das dendrites (Fig.10).

O aumento dos níveis da CaM e Ng nas dendrites estimuladas pode contribuir para o aumento do potencial pós-sináptico excitatório pelo aumento dos iões de cálcio, ativando as vias de sinalização das proteínas Ca²⁺/CaM dependentes e a estabilização dos recetores dos neurotransmissores⁶. Todas as células do hipocampo que foram estimuladas apresentaram um acréscimo de Ng no citoplasma (Fig.11) relativamente ao núcleo quando comparados com células do controlo (Fig.5), que apresentaram aparentemente a mesma quantidade de Ng no núcleo e no citoplasma. Enquanto outras células apresentaram uma aglomeração de Ng numa zona próxima às dendrites. Esse aumento no citoplasma não foi observado na CaM, por outro lado notou-se uma fraca quantidade de CaM próximo das dendrites, possivelmente provenientes do núcleo. Este aumento da quantidade de Ng e CaM no citoplasma podem contribuir para o aumento da potenciação da amplitude da camada das células estimuladas.

Através destes resultados pode-se dizer que proteínas de pequena dimensão como a CaM e Ng deslocam-se livremente por diferentes compartimentos celulares, estas proteínas estão distribuídas assimetricamente na soma e nas dendrites, com uma distribuição maior na soma, a CaM encontra-se em maior quantidade no núcleo do que a Ng, pensa-se que isto é devido ao facto de que a CaM pode entrar no núcleo através de mecanismos dependentes e independentes do cálcio⁶.

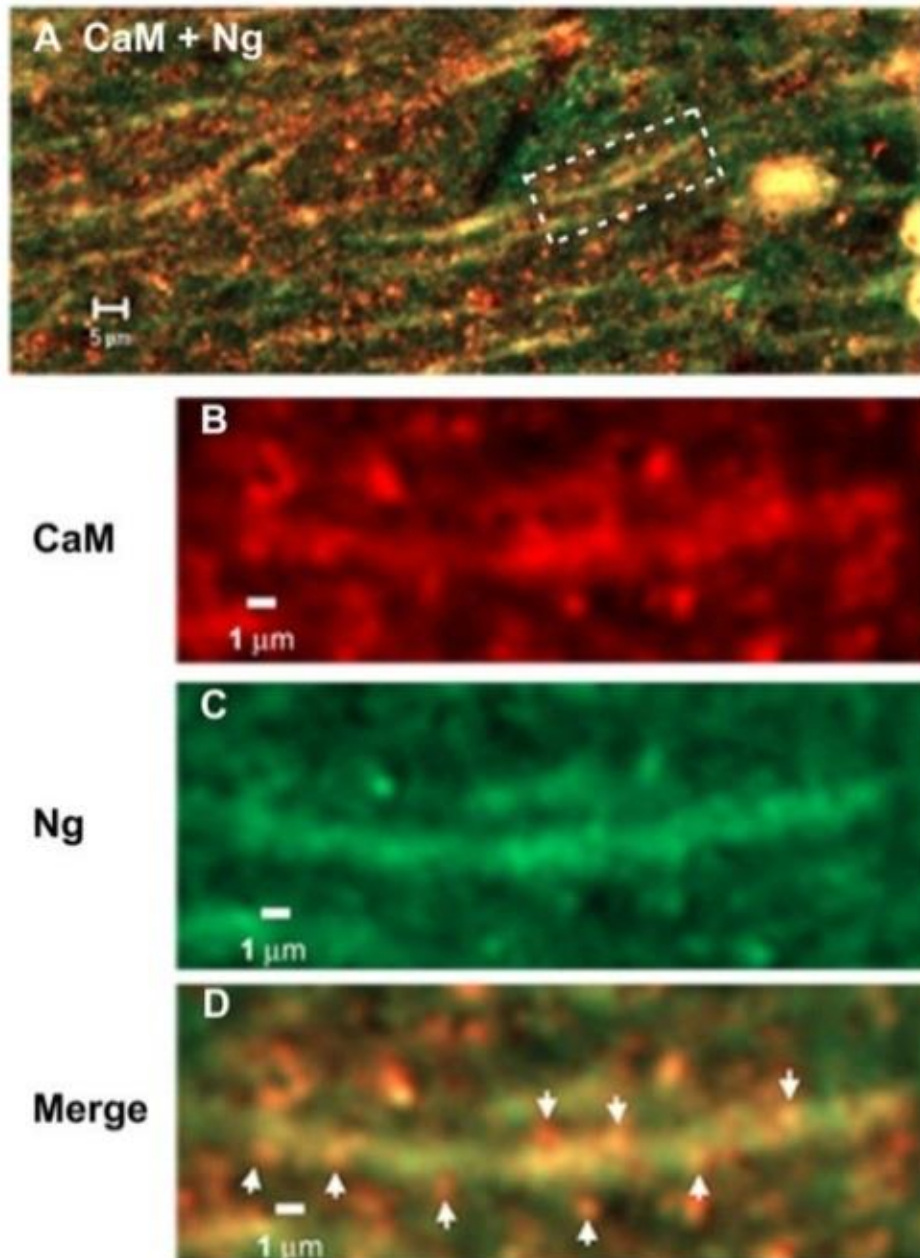


Figura 10- Associação da CaM e Ng nas dendrites após estimulação em neurónios da região CA1 do hipocampo⁶. A imagem obtida por microscópio em (A) foi aumentada através de um programa informático de modo a conseguir uma melhor ilustração da relação entre a CaM (B) e Ng (C). Verifica-se que a CaM e a Ng estão colocalizadas na superfície das dendrites apicais (D).

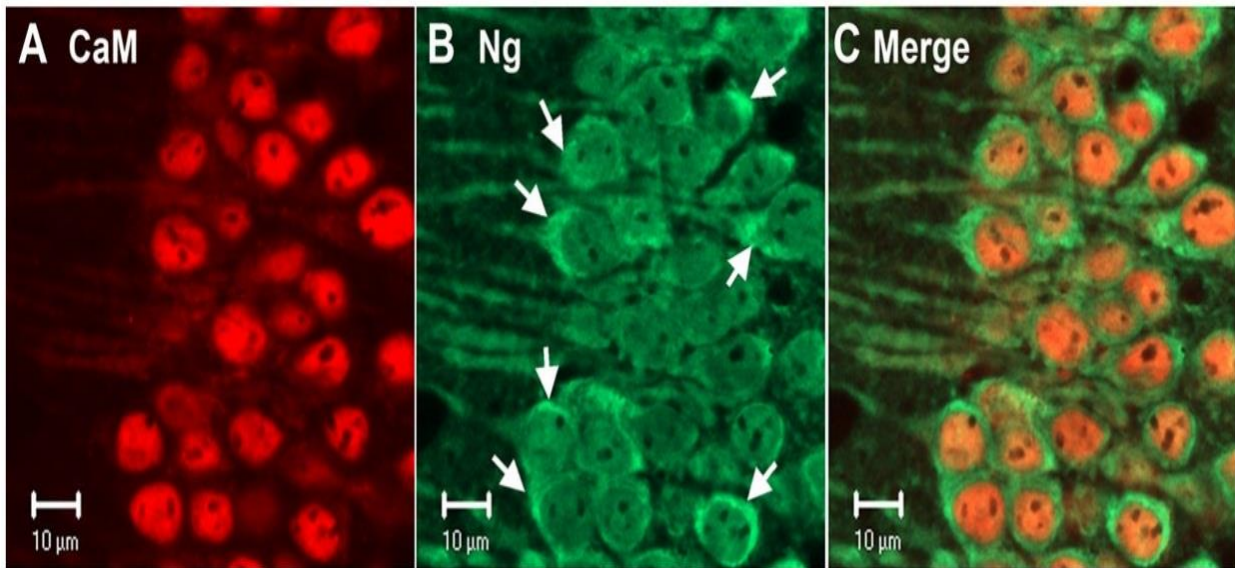


Figura 11- Saída da CaM e da Ng do núcleo para o citoplasma e dendrites em neurónios estimulados⁶. Após estimulação de alta frequência durante 60 minutos em neurónios da região CA1 do hipocampo verifica-se uma distribuição da CaM (A) e Ng (B) no citoplasma e dendrites mais próximas. É possível verificar que a Ng aparece em maior quantidade no citoplasma (B – assinalado pelas setas).

3.6 Translocação da calmodulina e da neurogranina da soma para as dendrites durante a sinapse mediante estimulação de alta frequência.

O estudo da mobilização da CaM e da Ng do soma para os dendrites por eletrofisiologia é uma das formas de analisar e compreender melhor a relação entre estas duas proteínas quando existe uma variação no gradiente de concentração intracelular de cálcio após estímulo nervoso.

Através de estimulação de alta frequência (HFS) aplicada à células CA1 do hipocampo e a posterior coloração por imunofluorescência verificou-se pelo aumento da intensidade fluorescência na zona das dendrites que há uma mobilização da CaM da soma para as dendrites mais precisamente para a zona onde foi colocado o eletródo e verificou-se ainda uma diminuição da intensidade de fluorescência progressiva com o aumento da distância do eletródo, para compreender melhor a relação entre a quantidade de CaM mobilizada para os dendrites com a distância do eletródo, realizou-se a mesma experiencia mas agora com dois

eletródos o primeiro a 100 Hz e o segundo a 0,05 Hz (controlo), onde se verificou um aumento de fluorescência perto do primeiro eletródo do que no segundo (Fig. 12), onde também se verificou a diminuição de fluorescência em zonas mais distantes ao primeiro eletródo o que indica uma baixa quantidade de CaM nos dendrites, estes resultados indicam que a estimulação de alta frequência é altamente específico para os caminhos de sinalização⁶ e que a CaM só é mobilizada para os dendrites apenas quando há atividade neuronal.

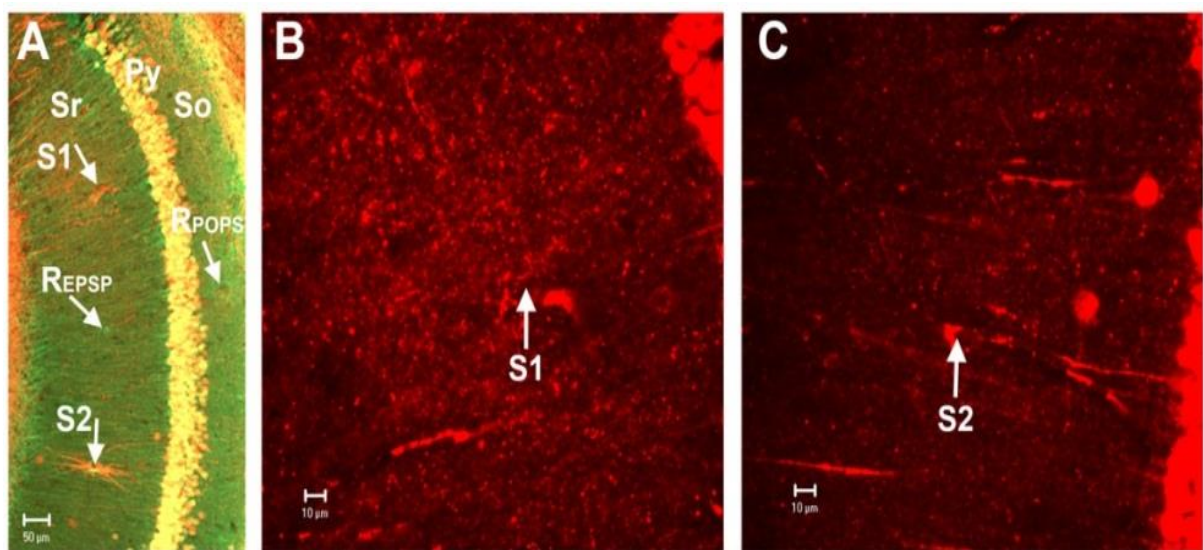


Figura 12- Aumento da deslocação da CaM da soma para as dendrites através de estimulação de alta frequência. E possível verificar que no eletródo 1 (S1) (100 Hz) existe uma maior concentração de CaM (B) em relação ao segundo eletródo de controlo (0,05 Hz) (S2), verifica-se ainda que a quantidade de CaM mobilizada é maior na zona junto ao primeiro eletródo o que indica uma maior especificidade deste processo de mobilização, que só é efetuado quando há um estímulo⁶.

3.7 Estudo da CaM e Ng deslocalizadas da soma para as dendrites

Para determinar a quantidade de CaM e Ng transcoladas da soma para as dendrites, compararam-se os raios de fluorescência emitida após estimulação junto do eletródo com os do controlo. O crescimento de CaM dendrito das células do controlo (WT) estimuladas foi superior quando comparadas com células sem a capacidade de expressar a Ng (NgKO) e

células tratadas com um inibidor dos recetores NMDA (N-methyl-D-aspartate) o AP5 (amino-5-fosfonovalérico) (WT+AP5). Verificou-se que não houve grandes diferenças na quantidade de CaM dendrito nas células NgKO quando comparadas com as WT+AP5 (Fig.13), estes resultados indicam que a CaM precisa da Ng para se deslocar do soma para os dendrites e também mostram que este processo depende da ativação dos recetores NMDA já que houve uma diminuição da CaM após adição do inibidor AP5.

A estimulação de alta frequência induz uma potenciação de longa duração tardia que origina um aumento da CaM nas dendrites na zona onde estão os eletródos, a translocação da CaM da soma para as dendrites vai desencadear a ativação dos enzimas Ca^{2+} /CaM-dependentes, como por exemplo a αCaMKII , que requer uma concentração elevada de CaM para uma atividade ótima. A αCaMKII tem um papel muito importante na regulação da excitação neuronal e na plasticidade sináptica¹⁵⁻¹⁸. A mobilização da CaM e da Ng do soma para os dendrites mediante estimulação podem melhorar a resposta sináptica através do aumento dos níveis dos transientes de cálcio e a ativação de enzimas Ca^{2+} /CaM dependentes. Em condições normais de baixa $[\text{Ca}^{2+}]_i$, uma grande fração de CaM vai ligar-se à Ng e a CaM livre será um fator limitante para a ativação dos enzimas dependentes da CaM . A mobilização da Ng com CaM da soma para as dendrites e a sua acumulação na mesma podem manter um elevado nível de Ca^{2+} durante o influxo de cálcio. Isto é baseado na previsão que o complexo Ng/CaM impede a interação direta do Ca^{2+} com a CaM, que facilita a libertação de Ca^{2+} do complexo Ca^{2+} /CaM^{6,7}.

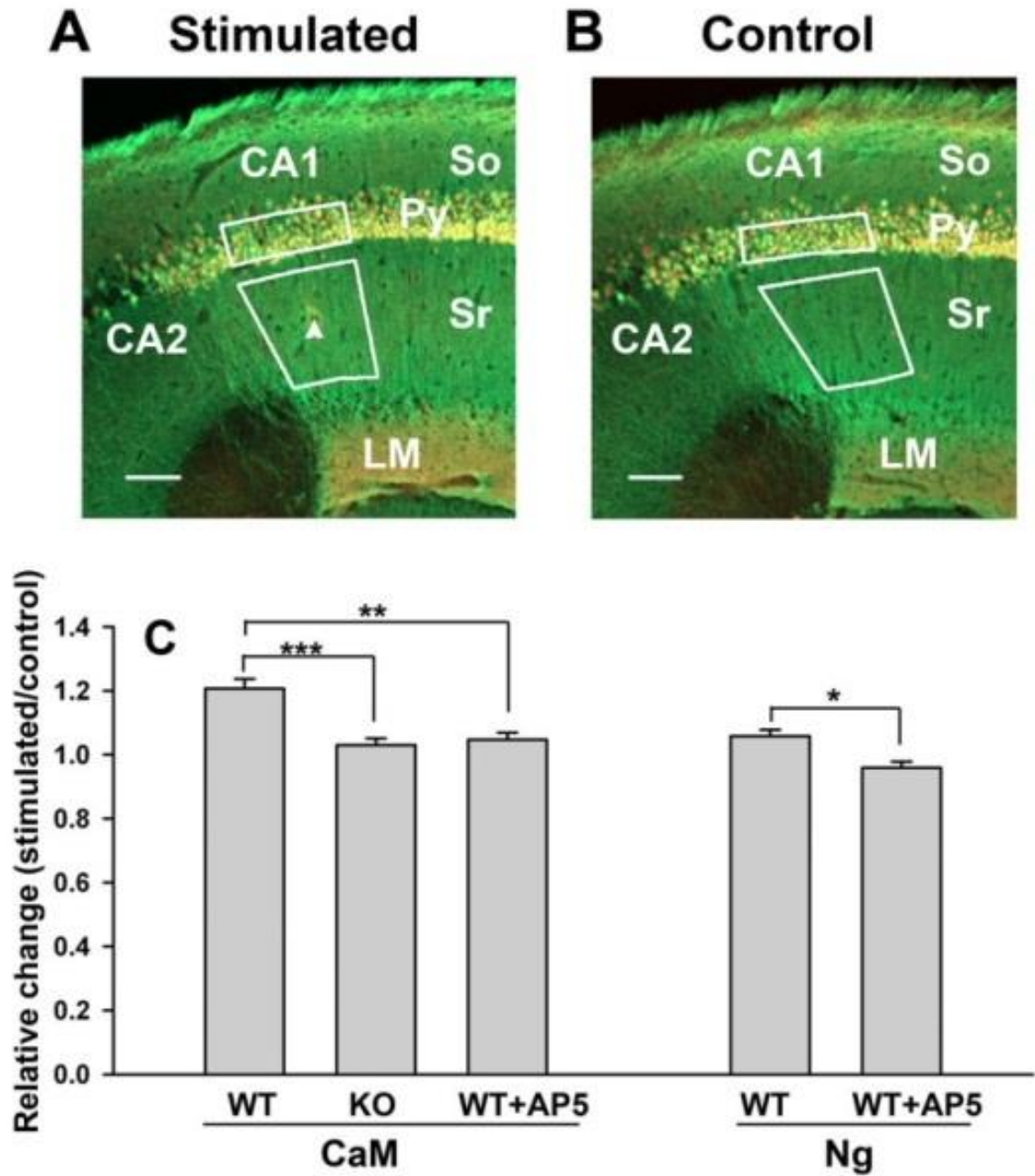


Figura 13- Quantificação da fração de CaM e Ng deslocadas da soma para as dendrites por estimulação de alta frequência⁶. (A) cortes do hipocampo sujeitos a estimulação de alta frequência durante 60 minutos. (B) cortes do hipocampo utilizados no controlo. (C) gráfico das alterações registadas em cortes sujeitos à estimulação quando comparadas ao controlo, para a CaM no wild type (WT), numa situação de NgKO e na presença do inibidor AP5 (WT+AP5) e para a Ng. Verifica-se que a mobilização da CaM diminui na ausência da Ng e na presença do inibidor AP5, isto aponta que a CaM precisa da Ng para que haja uma maior eficácia na mobilização da CaM e também que a mobilização da CaM depende da ativação dos recetores de NMDA.

4. Conclusão

O estudo do comportamento de proteínas com uma grande afinidade com o cálcio numa situação de variação da homeostasia do cálcio pode ser uma forma eficiente da análise o quanto é importante a manutenção dos níveis de concentração intracelular e extracelular de cálcio. A calmodulina e neurogranina são duas dessas proteínas, localizadas maioritariamente no núcleo e citoplasma, a calmodulina é uma proteína com uma grande afinidade ao cálcio e é responsável pela ativação e regulação de vários processos biológicos como por exemplo, ativação de cinases, controlo de canais de iões entre outras. A baixa quantidade de CaM nos dendrites leva a crer que deve existir uma mobilização desta do soma para os dendrites onde desencadear uma serie de reações como a ativação das cinases Ca^{2+} /CaM-dependentes.

As técnicas de aquisição de imagens de fluorescência a partir de sondas de identificação de cálcio e estimulação de alta frequência revelaram-se ser uma ferramenta importante para o estudo de mecanismos de comunicação entre neurónios e fornecem uma nova perspectiva na criação de modelos de estudo das sinapses.

Concluiu-se que a alteração da concentração extracelular de cálcio induz uma diferença de potencial que simula a atividade neuronal. Isto faz com que haja uma mobilização da calmodulina e da neurogranina do soma para os dendrites. A adição de EGTA apenas causa uma ligeira diminuição na concentração intracelular sem causar danos irreversíveis já que adição de cálcio reestabelece os níveis de concentração em condições normais.

No estudo da aplicação de um estímulo concluiu-se também que existe essa mesma mobilização. Concluiu-se ainda que a mobilização da CaM depende da Ng e da atividade dos recetores NMDA.

Referências

- [1] Tour O., Adams SR., Kerr RA., Meijer RM., Sejnowski TJ., Tsien RX e Tsien RY. (2007) *Calcium Green FAsH as a genetically targeted small-molecule calcium indicator*. Nature Chemical Biology. Volume 3, Nº 7, pp 423-431.
- [2] McCue HV., Haynes LP. e Burgoyne RD. (2012) *The Diversity of Calcium Sensor Proteins in the Regulation of Neuronal Function*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [3] Kerrigan TL., Whitcomb1 DJ. , Regan P. e Cho K. (2012). *The role of neuronal calcium sensors in balancing synaptic plasticity and synaptic dysfunction*. Frontiers in Molecular Neuroscience. Volume 5. Article 57.
- [4] Huang KP. e Huang FL.. (2011). *Calcium-Sensitive Translocation of Calmodulin and Neurogranin between Soma and Dendrites of Mouse Hippocampal CA1 Neurons*. ACS Chem. Neuroscience
- [5] Freire A, Halpern MJ e Quintas A. (2008) Metabolismo dos Aminoácidos. In: Freire A, Halpern MJ e Quintas A. *Bioquímica- Organização Molecular da Vida*. Lisboa, Lidel edições técnicas, pp 528 e 541-542.
- [6] Huang KP, Huang FL e ShettyPK. (2012) *Stimulation- mediated translocation of calmodulina and neurogranins from soma to dendrites of mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons*.Neurosciense.
- [7] Díez-Guerra FJ. (2010) *Neurogranin, a Link Between Calcium/Calmodulin and Protein Kinase C Signaling in Synaptic Plasticity*. Life, Volume 62, pp 597–606.
- [8] Zou J., Ye Y., Welshhans K., Lurtz M., Ellis AL., Louis C., Rehder V., Yang JJ. (2005) *Expression and optical properties of green fluorescent protein expressed in different cellular environments*. Journal of Biotechnology, Volume 119, pp 368–378.
- [9] GSU Chemistry (2006) Jenny J Yang– Signaling [Internet] Department of Chemistry, Georgia State University. Disponível em:

<http://chemistry.gsu.edu/faculty/Yang/Signaling.htm/> [06 de Setembro de 2012]

[10] Tang S., Wong HC., Wang ZM., Huang Y., Zou J., Zhuo Y., Pennati A., Gadda G., Delbono O. e Yang JJ. (2011) *Design and application of a class of sensors to monitor Ca^{2+} dynamics in high Ca^{2+} concentration cellular compartments*. PNAS. Volume 108, Nº. 39, pp 16265–16270.

[11] Mori MX., Imai Y., Itsuki K. e Inoue R.. (2011) *Quantitative Measurement of Ca^{2+} -Dependent Calmodulin-Target Binding by Fura-2 and CFP and YFP FRET Imaging in Living Cells*. Biochemistry, Volume 50, pp 4685–4696.

[12] Siegel F., Lohmann C.. (2011) *Probing synaptic function in dendrites with calcium imaging*. Experimental Neurology.

[13] Albantakisa L., Lohmann C. (2009) *A simple method for quantitative calcium imaging in unperturbed developing neurons*. Journal of Neuroscience Methods. Volume 184, pp 206–212.

[14] Life Technologies (2011) Fura-2 Calcium Indicator [Internet] Disponível: http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-andServices/Applications/Drug-Discovery/Target-and-Lead-Identification-and-Validation/g-protein_coupled_html/cell-based-second-messenger-assays/Fura-2-calcium-indicator.html [07 de Setembro de 2012]

[15] Marsdena KC., Shemesha A., Bayerb KU. e Carrolla RC. (2010) *Selective translocation of Ca^{2+} /calmodulin protein kinase IIa (CaMKIIa) to inhibitory synapses*. PNAS. Volume 107, Nº.47, pp20559-20564.

[16] Thalhammer A., Rudhard Y., Tigaret CM., Volynski KE., Rusakov DA. e Schoepfer R.. (2006) *CaMKII translocation requires local NMDA receptor-mediated Ca^{2+} signaling*. The EMBO Journal, Volume 25, pp 5873–5883.

[17] Yamagata Y., Kobayashi S., Umeda T., Inoue A., Sakagami H, Fukaya M., Watanabe M., Hatanaka N., Totsuka M., Yagi T., Obata K., Imoto K., Yanagawa Y., Manabe T. e

Okabe S. (2009) *Kinase-Dead Knock-In Mouse Reveals an Essential Role of Kinase Activity of Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in Dendritic Spine Enlargement, Long-Term Potentiation, and Learning*. The Journal of Neuroscience, Volume 29, pp 7607–7618.

[18] Asrican B., Lisman J. e Otmakhov N. (2007) *Synaptic Strength of Individual Spines Correlates with Bound Ca^{2+} -Calmodulin-Dependent Kinase II*. The Journal of Neuroscience, Volume 27, pp 14007–14011.